製品コード 5301

研究用

TaKaRa

EpiScope® Promoter qPCR Array (Human)

説明書

v201203Da

EpiScope Promoter qPCR Array (Human) は、EpiXplore™ Methylated DNA Enrichment Kit（製品コード 631963/631962）やクロマチン免疫沈降法によりゲノム DNA の目的領域を濃縮後、DNA メチル化による発現調節が報告されている遺伝子のゲノム DNA 領域を、リアルタイム PCR（qPCR）で定量するためのプライマーセットです。プライマーは、25 種類の遺伝子（スプライスバリアントを含む 30 種類）をターゲットとして、転写開始点上流付近に設計されています。また、コントロールとして、リピート配列である LINE-1 検出用および DNA メチル化のネガティブコントロールとなる GAPDH 検出用のプライマーも含まれています。各プライマーセットは、SYBR® *Premix Ex Taq* GC（Perfect Real Time）（製品コード RR071A/B）で良好に反応することを確認しています。
なお、興味深い結果が得られた遺伝子に関してより詳細な解析を行うため、個々のプライマーを別途ご購入いただくことも可能です。

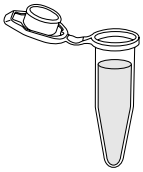
【操作の流れ】

本製品を用いたリアルタイム PCR の操作フローを以下に示します。（ ）内は 1 回のリアルタイム PCR 実験に要する時間の目安で、全工程は約 2 ～ 3 時間で終了します。

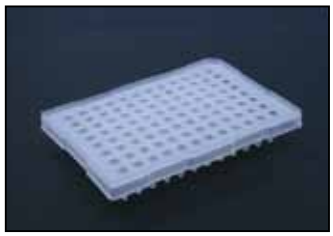
～ 操作フロー ～

リアルタイム PCR 反応液の分注（約 10 分）

鋳型 DNA と SYBR® *Premix Ex Taq* GC（Perfect Real Time）を混合してマスターミックスを調製し、リアルタイム PCR 反応プレートに分注する。



マスターミックス

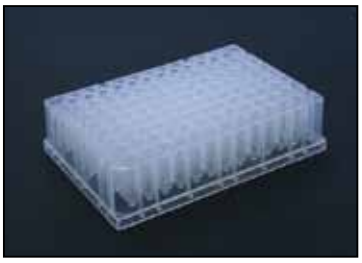


リアルタイム PCR 反応プレート

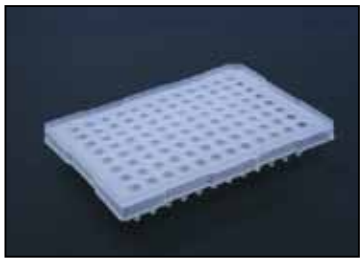
↓

プライマーの添加（約 5 分）

8 連マルチチャンネルピペットなどを用いて、EpiScope Promoter qPCR Array のプライマーを上記のリアルタイム PCR 反応プレートに添加する。



EpiScope Promoter qPCR Array (Human)



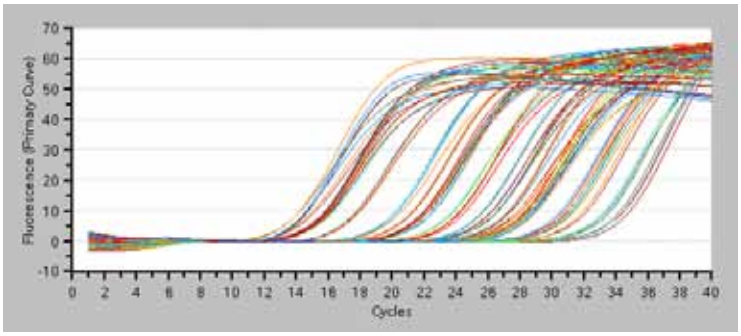
リアルタイム PCR 反応プレート

↓

↓

リアルタイム PCR（1 ～ 2 時間）

リアルタイム PCR 装置でリアルタイム PCR を実施する。



I. 内容

ターゲット遺伝子検出用プライマー　　50 μl × 30 ウェル（× 3 レプリケート）
コントロール遺伝子検出用プライマー　　50 μl × 2 ウェル（× 3 レプリケート）

※ 各ウェルに Forward & Reverse primer mix（各 2.5 μM）が含まれる。
※ 25 μl 反応系の場合、1 反応あたり 2 μl を使用する。

【注意】ラバーマット（フタ）は繰り返し使用しますので、取り扱いに注意し、大切に保管してください。

＜プライマー配置図＞

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	9	17	25	1	9	17	25	1	9	17	25
B	2	10	18	26	2	10	18	26	2	10	18	26
C	3	11	19	27	3	11	19	27	3	11	19	27
D	4	12	20	28	4	12	20	28	4	12	20	28
E	5	13	21	29	5	13	21	29	5	13	21	29
F	6	14	22	30	6	14	22	30	6	14	22	30
G	7	15	23	31	7	15	23	31	7	15	23	31
H	8	16	24	32	8	16	24	32	8	16	24	32
	Replicate 1				Replicate 2				Replicate 3			

＜遺伝子リスト＞

No.	Primer Set ID	Symbol	GeneID	RefSeq	増幅サイズ	設計位置
1	HG010001	APC	324	NM_001127510	157	CpG アイランドなし
2	HG010002	APC	324	NM_001127511	148	
3	HG010003	BNIP3	664	NM_004052	63	CpG アイランド内、1st イントロン
4	HG010004	BRCA1	672	NM_007297	100	
5	HG010005	CADM1	23705	NM_001098517	80	
6	HG010006	CCNA1	8900	NM_003914	69	
7	HG010007	CCNA1	8900	NM_001111046	90	
8	HG010008	CCND2	894	NM_001759	71	
9	HG010009	CDH1	999	NM_004360	108	
10	HG010010	CDKN2A	1029	NM_000077	123	
11	HG010011	CDKN2A	1029	NM_058195	75	CpG アイランド内、1st エキソン
12	HG010012	CDKN2B	1030	NM_004936	88	
13	HG010013	CHFR	55743	NM_001161344	95	
14	HG010014	DAPK1	1612	NM_004938	112	
15	HG010015	DKK3	27122	NM_013253	129	
16	HG010016	ESR1	2099	NM_000125	93	CpG アイランド内、5′ UTR
17	HG010017	FHIT	2272	NM_002012	80	
18	HG010018	GSTP1	2950	NM_000852	61	
19	HG010019	LOX	4015	NM_002317	141	CpG アイランド内、5′ UTR
20	HG010020	MGMT	4255	NM_002412	108	
21	HG010021	MLH1	4292	NM_000249	149	
22	HG010022	PTGS2	5743	NM_000963	95	
23	HG010023	RARB	5915	NM_000965	134	CpG アイランドなし
24	HG010024	RASSF1	11186	NM_007182	94	
25	HG010025	RASSF1	11186	NM_170712	127	
26	HG010026	RASSF1	11186	NM_170713	102	
27	HG010027	RB1	5925	NM_000321	144	
28	HG010028	SFRP1	6422	NM_003012	128	
29	HG010029	VHL	7428	NM_000551	93	CpG アイランド内、5′ UTR
30	HG010030	WT1	7490	NM_000378	124	
31	HG010031	LINE-1	-	-	81	
32	HG010032	GAPDH	2597	NM_002046	81	

※ 設計位置に関してコメントがないものは、転写開始点付近の CpG アイランド内またはその近傍に設計

※ CpG アイランドが存在しない遺伝子については、転写開始点上流 500 bp 以内に設計

II. 本製品以外に必要な試薬、器具（主なもの）

・リアルタイム PCR 装置
　Thermal Cycler Dice Real Time System *II* シリーズ（製品コード TP900/TP960）など
・リアルタイム PCR 装置専用の反応プレートおよびシール
・8 連マルチチャンネルピペット、マイクロピペットおよびチップ
・プレート遠心機
・リアルタイム PCR 試薬
　SYBR® *Premix Ex Taq* GC（Perfect Real Time）（製品コード RR071A/B）をご使用ください。

＜ DNA メチル化解析の場合＞
・DNA 抽出試薬
　NucleoSpin® Tissue（製品コード 740952.10/.50/.250）
・メチル化 DNA 濃縮試薬
　EpiXplore™ Methylated DNA Enrichment Kit（製品コード 631963/631962）

III. 保存

－ 20℃

※ 適切に保存し、受取り後 1 年を目途にご使用ください。

※ 短期間（～ 1 ヵ月）に繰り返し使用する場合には 4℃で保存してください。ただし、本製品は防腐剤を含んでおりませんので、コンタミネーションには十分にご注意ください。

＊使用上の注意：
EpiScope Promoter qPCR Array を－ 20℃で凍結保存している場合には、使用する前に冷凍庫から取り出し室温で溶解させます。その後、プライマー溶液の濃度が均一になるように、ラバーマット（フタ）が密着していることを確認した上で qPCR Array 全体を振って撹拌し、ウェル壁面の溶液を底に落とすためにプレート遠心機で軽くスピンダウンします。
EpiScope Promoter qPCR Array を 4℃で冷蔵保存している場合には、使用する前に冷蔵庫から取り出し、同様にプライマー溶液を撹拌し、軽くスピンダウンします。

IV. 操作（Thermal Cycler Dice Real Time System *II* を用いる場合）

本製品以外の試薬および装置の操作方法については各製品の取扱説明書も併せてご参照ください。
他の装置での使用法は、VI. Appendix（10 ページ）を参照してください。

1. 準備

EpiScope Promoter qPCR Array を－ 20℃で凍結保存している場合には、使用する前に冷凍庫から取り出し室温で溶解させます。その後、プライマー溶液の濃度が均一になるように、ラバーマット（フタ）が密着していることを確認した上で qPCR Array 全体を振って撹拌し、ウェル壁面の溶液を底に落とすためにプレート遠心機で軽くスピンダウンします。
EpiScope Promoter qPCR Array を 4℃で冷蔵保存している場合には、使用する前に冷蔵庫から取り出し、同様にプライマー溶液を撹拌し、軽くスピンダウンします。

2. リアルタイム PCR 反応プレートの作製

ここでは 2 種類のサンプルの比較のため、1 枚のリアルタイム PCR 反応プレートを作製する場合を示します。サンプル数などに応じて適宜変更してください。

2-1. マスターミックスの調製と分注

鋳型 DNA と SYBR® *Premix Ex Taq* GC（Perfect Real Time）を混合してマスターミックスを調製し、リアルタイム PCR 用のプレートに分注します。

（1）それぞれの鋳型 DNA を用いて、下記に示すマスターミックス（PCR 反応液）を調製する。

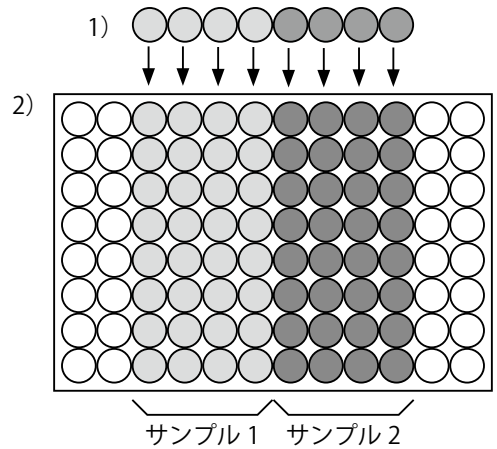
	1 ウェル分	40 ウェル分
SYBR® *Premix Ex Taq* GC（2 ×）	12.5 μl	500 μl
DNA 溶液	1 μl ＊	40 μl
dH_2O（滅菌蒸留水）	9.5 μl ＊	380 μl
Total	23 μl	920 μl

＊：DNA 濃度により、適宜調整可能。濃縮前のゲノム DNA 相当量で、1 ウェルあたり 20 ～ 100 ng 程度を用いると良い。

（2）リアルタイム PCR 用プレートの各ウェルに 23 μl ずつ分注する。

8 連マルチチャンネルピペットを用いる場合の分注操作例

1）適当な容器に、マスターミックスを 9 ウェル分（207 μl）ずつ分注する。
2）8 連のマルチチャンネルピペットでリアルタイム PCR 用プレートの各ウェルに 23 μl ずつ分注する。



2-2. プライマーの添加

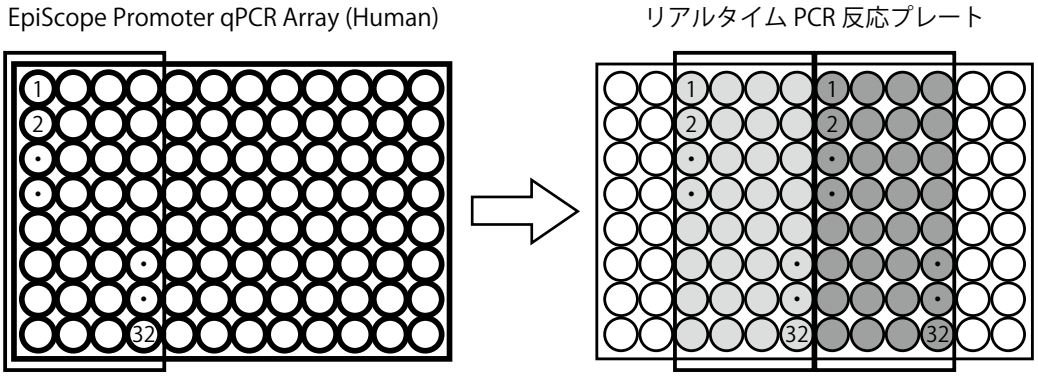
マスターミックスを分注済のリアルタイム PCR 用プレートに EpiScope Promoter qPCR Array のプライマーを添加します。

（1） qPCR Array のラバーマットをはずす。
プライマー溶液が飛び散らないようにラバーマットを注意深くはずします。プライマー溶液が飛び散るとプライマー間のコンタミネーションの原因となりますので、ご注意ください。

（注）qPCR Array はあらかじめプライマー溶液をよく混合し、プレートを軽くスピンダウンしてから使用してください（IV-1. 準備 参照）。

（注）使用後は、再びラバーマットでフタをして保存します。ラバーマットは捨てないでください。

（2） プライマーを分注する。
qPCR Array の各ウェルのプライマーをマスターミックスの入ったリアルタイム PCR プレートの対応するウェルに 2 μl ずつ分注します。



（例）Replicate 1 からサンプル 1, 2 の各ウェルに分注する。

（3） リアルタイム PCR 用プレートに Sealing Film を貼る。
専用のヘラ（Plate Sealing Pad）を用いて確実に Sealing Film をプレートに密着させます。密着していない部分があるとリアルタイム PCR 反応中に Sealing Film がはがれて反応液が蒸発し、正確に測定できないことがあります。

※ これでリアルタイム PCR 反応プレートの調製は完了です。すぐにリアルタイム PCR を開始しない場合は、プレートを遮光して 4℃で保存してください。プレート調製後は、24 時間以内に反応を開始することをお勧めします。

（4） qPCR Array にラバーマットでフタをする。

（注）ラバーマットを確実にプレートに密着させます。確実に密着していないと qPCR Array 保存中のプライマー溶液の蒸発やコンタミネーションの原因となります。

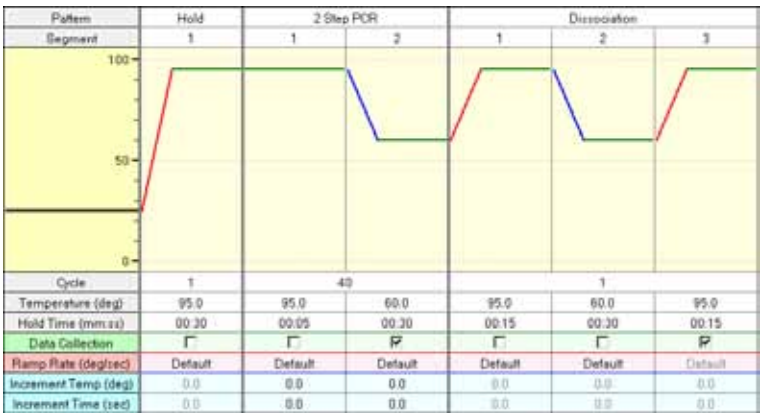
（注）ラバーマットは元通りの方向で使用してください。方向を間違えるとコンタミネーションの原因となります。

3. リアルタイム PCR の実施

調製済みのリアルタイム PCR 反応プレートをリアルタイム PCR 装置にセットし、リアルタイム PCR を実施します。

（1） リアルタイム PCR プレートを軽く遠心して、ウェル壁面の水滴を落とし底部の気泡などを除く。
（2） リアルタイム PCR 装置に（1）のプレートをセットする。
（3） 以下の反応条件でリアルタイム PCR を行う。

初期変性
　95℃ 30 秒
2 Step PCR
　95℃ 5 秒
　60℃ 30 秒
　（40 サイクル）
融解曲線分析



4. データ解析法

【解析の手順】

リアルタイム PCR の解析法には、検量線を用いる方法と検量線を用いない ΔΔ Ct 法があります。EpiScope Promoter qPCR Array (Human) による定量では、検量線を作成しませんので、ΔΔ Ct 法と同じ考え方で解析します。また、解析結果は、濃縮前（インプット）の量に対する濃縮後のサンプルの割合（インプット %）、または非結合画分と結合画分の割合などで表わされます。

A. インプットサンプルと濃縮サンプルを比較する場合（インプット % の算出）
　A-1. リアルタイム PCR の結果から Ct 値を算出する
　A-2. Ct 値を以下の式で定量値に換算する
　　定量値（Qty.）$= 2^{(-Ct)}$
　A-3. 濃縮サンプルの割合を求める

$$\text{濃縮サンプル（\%）} = \frac{\text{濃縮サンプル Qty.}}{\text{インプットサンプル Qty.}} \times 100$$

（解析例）

	Ct 値	定量値	%
インプットサンプル	20	9.5E-07	100.0
濃縮サンプル	20.5	6.7E-07	70.7

B. 非結合画分と結合画分を比較する場合
   B-1. リアルタイム PCR の結果から Ct 値を算出する
   B-2. Ct 値を以下の式で定量値に換算する
        定量値（Qty.）＝ $2^{(-Ct)}$
   B-3. 各画分の割合を求める

$$非結合画分（\%）= \frac{非結合画分\ Qty.}{非結合画分\ Qty. ＋結合画分\ Qty.} \times 100$$

$$結合画分（\%）= \frac{結合画分\ Qty.}{非結合画分\ Qty. ＋結合画分\ Qty.} \times 100$$

（解析例）

	Ct 値	定量値	%
非結合画分	20	9.5E-07	33.3
結合画分	19	1.9E-06	66.7

【EpiScope Promoter qPCR Array Analysis Tool による解析】

本解析ツールを使用すると、Ct 値を入力するだけで自動的に前述の解析を行いグラフ化することができます。96 ウェルプレート 2 枚分のデータを入力でき、1 ～ 3 セットの Input および Bound データ、または 1 ～ 3 セットの Unbound および Bound データに対応しています。
本解析ツールは、タカラバイオウェブカタログの EpiScope Promoter qPCR Array (Human) の製品ページからダウンロードしてご利用いただけます。
URL: http://www.takara-bio.co.jp/qpcr-array_tool/

V. 実験例

HeLa S3 細胞、A549 細胞から抽出したゲノム DNA を断片化し、各 1.5 μg を EpiXplore™ Methylated DNA Enrichment Kit による DNA メチル化領域の濃縮に用い、最終的に、それぞれ 45 μl の非結合画分（FT）および結合画分（EL）の濃縮物を得た。1 反応あたり 1 μl の濃縮物をリアルタイム PCR の鋳型として使用し、EpiScope Promoter qPCR Array (Human) と SYBR® *Premix Ex Taq* GC (Perfect Real Time) を用いてリアルタイム PCR を行った。解析結果を図 1（次ページ）に示す。

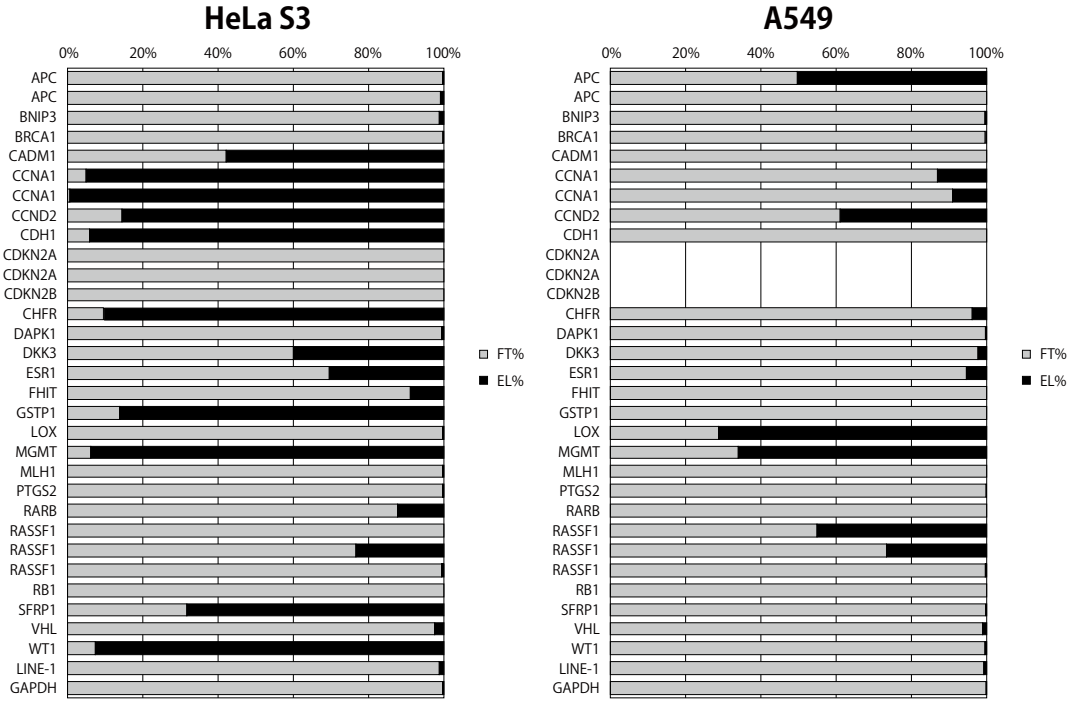


図 1. 培養細胞 2 種の DNA メチル化解析結果
EpiXplore™ の非結合画分（FT；グレイ）および結合画分（EL；黒）の定量値をパーセンテージで表した。いくつかの遺伝子において、細胞の種類により濃縮度合いが大きく異なることが確認され、これらの遺伝子の転写開始点上流付近の DNA メチル化状態に違いがあることが示唆された。なお、A549 の CDKN2A と CDKN2B は、非結合画分・結合画分ともに検出されなかった。

VI. Appendix

＜各リアルタイム PCR 装置での使用方法＞

＊各機種の取扱説明書に従って操作してください。
＊実験操作の詳細や注意事項は、「IV. 操作」をご参照ください。

【ABI PRISM® 7000、Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System（Life Technologies 社）】

（1）それぞれの鋳型 DNA を用いて、下記に示すマスターミックス（PCR 反応液）を調製する。

	1 ウェル分	40 ウェル分
SYBR® *Premix Ex Taq* GC（2 ×）	25 μl	1,000 μl
ROX Reference Dye or Dye II（50 ×）＊1	1 μl	40 μl
DNA 溶液	2 μl ＊2	80 μl
dH_2O（滅菌蒸留水）	18 μl ＊2	720 μl
Total	46 μl	1,840 μl

＊1：Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System では ROX Reference Dye II を使用します。ABI PRISM® 7000 では ROX Reference Dye を使用します。
＊2：DNA 濃度により、適宜調整可能。濃縮前のゲノム DNA 相当量で、1 ウェルあたり 20 ～ 100 ng 程度を用いると良い。

（2） リアルタイム PCR 用プレートの各ウェルに 46 μl ずつ分注する。
（3） （2） のプレートに、EpiScope Promoter qPCR Array の各ウェルのプライマーを 4 μl ずつ添加する。
（4） 以下の反応条件でリアルタイム PCR を行う。

初期変性
　95℃　　30 秒
2 Step PCR
　95℃　　5 秒
　60℃　31 秒 or 34 秒 ＊3
　（40 サイクル）
融解曲線分析

＊ 3：7000 では 31 秒に、7500 では 34 秒に設定する。

【Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System（Life Technologies 社）】

（1） それぞれの鋳型 DNA を用いて、下記に示すマスターミックス（PCR 反応液）を調製する。

	1 ウェル分	40 ウェル分
SYBR® *Premix Ex Taq* GC（2 ×）	10 μl	400 μl
ROX Reference Dye II（50 ×）	0.4 μl	16 μl
DNA 溶液	0.8 μl ＊	32 μl
dH_2O（滅菌蒸留水）	7.2 μl ＊	288 μl
Total	18.4 μl	736 μl

＊： DNA 濃度により、適宜調整可能。濃縮前のゲノム DNA 相当量で、1 ウェルあたり 20 ～ 100 ng 程度を用いると良い。

（2） リアルタイム PCR 用プレートの各ウェルに 18.4 μl ずつ分注する。
（3） （2）のプレートに、EpiScope Promoter qPCR Array の各ウェルのプライマーを 1.6 μl ずつ添加する。
（4） 以下の反応条件でリアルタイム PCR を行う。

初期変性
　95℃　　30 秒
2 Step PCR
　95℃　　10 秒
　60℃　　30 秒
　（40 サイクル）
融解曲線分析

VII. 関連製品

SYBR® *Premix Ex Taq*™ GC（Perfect Real Time）（製品コード RR071A/B）

Thermal Cycler Dice® Real Time System *II*（製品コード TP900/TP960）
Thermal Cycler Dice® Real Time System Single（製品コード TP850/TP870）

96well Hi-Plate for Real Time（製品コード NJ400）
Sealing Film for Real Time（製品コード NJ500）
NucleoSpin® Tissue（製品コード 740952.10/.50/.250）
EpiXplore™ Methylated DNA Enrichment Kit（製品コード 631963/631962）
EpiScope® Methylated HCT116 gDNA（製品コード 3522）
EpiScope® Unmethylated HCT116 DKO gDNA（製品コード 3521）

○ 個別プライマーの購入方法
EpiScope Promoter qPCR Array (Human) に搭載されたプライマーは、すべて個別にご購入いただけます。専用の注文書＊にプライマー情報リストに記載の Primer Set ID と必要事項を記入してご注文ください。通常納期は、受注後、5 営業日です。

＊：タカラバイオウェブカタログの EpiScope Promoter qPCR Array (Human) の製品ページでダウンロードできます。

VIII. 参考文献

1）吉崎美和 , 向井博之（2005）実験医学別冊 バイオ実験で失敗しない！「検出と定量のコツ」, 第 3 章 核酸の検出と定量のコツ 4. リアルタイム定量 PCR のコツ、120-126
2）吉崎美和 , 向井博之（2008）実験医学別冊 原理からよくわかる「リアルタイム PCR 実験ガイド」[3] 1）リアルタイム RT-PCR 法による遺伝子発現解析 , 39-43

IX. 注意

- 本製品は研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診 断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- SYBR® は Molecular Probe Inc. の登録商標です。その他、本説明書に記載されている商品名などは、特に記載がなくても各社の商標または登録商標です。ライセンスなどに関する最新の情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。

製品についての技術的なお問い合わせ先
TaKaRa テクニカルサポートライン
Tel 077-543-6116　Fax 077-543-1977
ホームページアドレス http://www.takara-bio.co.jp/

タカラバイオ株式会社

201203Da